

10/578627

1 1AP20 Rec'd 17 SEP 09 MAY 2006

**Verfahren zur Untersuchung von Cytosin-Methylierungen in  
DNA-Sequenzen mittels hemimethylierungssensitiver  
Restriktionsenzyme**

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur  
Untersuchung von Cytosinmethylierungen in DNA-Sequenzen.

**Hintergrund der Erfindung**

10 5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte  
Base in der DNA eukaryontischer Zellen. Sie spielt eine  
wichtige biologische Rolle, u.a. bei der  
Transkriptionsregulation, beim genetischen Imprinting und  
in der Tumorgenese (zur Übersicht: Millar et al.: Five  
15 not four: History and significance of the fifth base. In:  
The Epigenome, S. Beck and A. Olek, eds.: The Epigenome.  
Wiley-VCH Verlag Weinheim 2003, S. 3-20). Die  
Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil  
genetischer Information ist daher von erheblichen  
20 Interesse. Ein Nachweis der Methylierung ist allerdings  
schwierig, da Cytosin und 5-Methylcytosin das gleiche  
Basenpaarungsverhalten aufweisen. Viele der  
herkömmlichen, auf Hybridisierung beruhenden  
Nachweisverfahren vermögen daher nicht zwischen Cytosin  
25 und Methylcytosin zu unterscheiden. Zudem geht die  
Methylierungsinformation bei einer PCR-Amplifikation  
vollständig verloren.

Die gebräuchlichen Methoden zur Methylierungsanalyse  
30 arbeiten im wesentlichen nach zwei unterschiedlichen  
Prinzipien. Zum einen erfolgt eine selektive chemische  
Umwandlung von nicht-methylierten Cytosinen in Uracil  
(Bisulfit-Behandlung), zum anderen werden

methylierungsspezifische Restriktionsenzyme benutzt. Die enzymatisch oder chemisch vorbehandelte DNA wird dann meist amplifiziert und kann auf unterschiedliche Weise analysiert werden (zur Übersicht: WO 02/072880 S. 1 ff).

5

Die herkömmlichen Verfahren leiden unter mehreren Nachteilen. So ist die Bisulfitbehandlung zeit- und arbeitsaufwendig. Zudem besteht die Möglichkeit, dass die DNA nur unvollständig umgesetzt und außerdem zum Teil  
10 degradiert wird. Eine Quantifizierung ist sowohl bei der chemisch wie bei der enzymatisch vorbehandelten DNA schwierig. Erforderlich hierzu ist eine Amplifikation, meist eine PCR. Dieser zusätzliche Arbeitsschritt ist mit mehreren Problemen verbunden, etwa der Gefahr einer  
15 bevorzugten Amplifikation bestimmter Sequenzen (sog. „Bias“).

Das erfindungsgemäße Verfahren erfordert dagegen keine Amplifikation und erlaubt so eine schnellere und  
20 einfachere Analyse als die herkömmliche Methodik. Es ermöglicht zudem eine Quantifizierung. Im erfindungsgemäßen Verfahren wird die zu untersuchende DNA mit Oligonukleotiden eines definierten Methylierungszustandes hybridisiert. Dabei entstehen je  
25 nach Methylierungsstatus der zu untersuchenden DNA und der Oligonukleotide Hybride, die auf beiden DNA-Strängen entweder den gleichen oder einen unterschiedlichen Methylierungszustand besitzen. Anschließend werden die Hybride mit Restriktionsenzymen umgesetzt, wobei die  
30 Restriktion von dem Methylierungszustand der Hybride abhängig ist. Über unterschiedliche

Detektionsmöglichkeiten kann dann auf den Methylierungsstatus der DNA geschlossen werden.

5 Eine Hybridbildung und eine anschließende, unterschiedliche Restriktion der unterschiedlich methylierten Hybride wird auch bei dem sog. Genomic Mismatch Scanning (GMS) benutzt. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren zur Detektion von Polymorphismen. Dabei werden die DNA-Stränge zweier unterschiedlicher Individuen miteinander hybridisiert, wobei die DNA eines Individuums zuvor durch Einsatz von Enzymen künstlich methyliert wurde. Die entstandenen Homohybride werden dann anschließend enzymatisch verdaut, während die Heterohybride weiter analysiert werden (siehe etwa:  
10 Nelson et al.: Genomic mismatch scanning: a new approach to genetic linkage mapping. Nat Genet. 1993 May;4(1):11-8). Die künstliche Methylierung und die anschließende Restriktion dienen hier also der Isolierung der Heterohybride. Eine Nutzung der unterschiedlichen Restriktion unterschiedlich methylierter DNA-Hybride zur  
20 quantitativen Analyse der natürlichen DNA-Methylierungsmuster ist bisher noch nicht beschrieben.

#### Beschreibung

25 Im erfindungsgemäßen Verfahren wird die zu untersuchende DNA mit Oligonukleotiden eines definierten Methylierungsstatus hybridisiert und anschließend mit bestimmten Restriktionsenzymen umgesetzt. Die Restriktionsenzyme sind in der Lage, CpG-Sequenzen zu  
30 erkennen und zudem hemimethylierte DNA-Doppelstränge entweder von unmethylierten oder von homomethylierten DNA-Doppelsträngen zu unterscheiden. Diese

Restriktionsenzyme werden im folgenden als hemimethylierungssensitiv bezeichnet. Die Begriffe hemimethyliert, homomethyliert, unmethyliert und definierter Methylierungsstatus sind wie folgt zu verstehen: Sind die Cytosine in den zu untersuchenden CpG-Position methyliert, so bilden sie mit Oligonukleotiden, deren entsprechende CpG-Position nicht methyliert ist, Doppelstränge, bei denen diese spezielle CpG-Position nur auf einem Strang methyliert (hemimethyliert) ist. Das gleiche gilt für Hybride aus entsprechend methylierten Oligonukleotiden und unmethylierter zu untersuchender DNA. Sind dagegen sowohl Oligonukleotid wie auch DNA an der CpG-Position methyliert, so resultiert ein auf beiden Seiten methylierter Doppelstrang (Homomethylierung). Umgekehrt entstehen, wenn die CpG-Positionen sowohl in der zu untersuchenden DNA wie auch im Oligonukleotid unmethyliert sind, unmethylierte Doppelstränge. Die Begriffe hemimethyliert, homomethyliert und unmethyliert beschreiben im folgenden also nicht den Gesamt-Methylierungszustand der DNA, sondern nur den Zustand an einzelnen CpG-Positionen innerhalb der DNA. Unter einem definierten Methylierungsstatus ist zu verstehen, dass die Cytosine der eingesetzten Oligonukleotide in den CpG-Positionen, die den zu untersuchenden CpG-Positionen in der DNA entsprechen, entweder unmethyliert oder an der 5-Position methyliert vorliegen.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Methylierungsanalyse besteht aus folgenden vier Schritten:

- a) die zu untersuchende DNA wird an Oligonukleotide eines definierten Methylierungsstatus hybridisiert,
- b) die Hybride werden mit mindestens einem hemimethylierungssensitiven Restriktionsenzym umgesetzt,
- 5 c) es wird detektiert, ob eine Restriktion stattgefunden hat,
- d) es wird auf den Methylierungszustand der untersuchten DNA geschlossen.

10 Im ersten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die zu untersuchende DNA an Oligonukleotide hybridisiert. Dies kann sowohl in Lösung wie auch an einer Festphase erfolgen. Die zu untersuchende DNA kann aus unterschiedlichen Quellen stammen. Für diagnostische  
15 Zwecke können als Ausgangsmaterial u.a. Gewebeproben, aber auch Körperflüssigkeiten, insbesondere Serum, dienen. Denkbar ist auch, die DNA aus Sputum, Stuhl, Urin oder Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit zu verwenden. Bevorzugt wird die DNA aus den biologischen Proben  
20 isoliert. Die DNA-Extraktion erfolgt nach Standardmethoden, aus Blut etwa unter Verwendung des Qiagen UltraSens DNA Extraktions-Kits. Die isolierte DNA wird dann etwa durch Umsatz mit herkömmlichen (nicht hemimethylierungssensitiven) Restriktionsenzymen  
25 fragmentiert. Die Reaktionsbedingungen und die in Frage kommenden Enzyme sind dem Fachmann bekannt und ergeben sich etwa aus den von den Herstellern mitgelieferten Protokollen.

30 Je nach dem später zu verwendenden Restriktionsenzym sind die Oligonukleotide an den Cytosin-Positionen, die von dem Restriktionsenzym erkannt werden, unmethyliert oder

an der 5-Position methyliert. Für eine quantitative Analyse werden sowohl methylierte wie auch unmethylierte Oligonukleotide eingesetzt (s.u.). Die Synthese von entsprechend unmethylierten und methylierten Oligonukleotiden gehört zum Stand der Technik. In einer weiteren bevorzugten Variante werden mehrere Oligonukleotide unterschiedlicher Sequenz verwendet, so dass eine Untersuchung mehrerer Methylierungspositionen gleichzeitig möglich ist.

10

In einer bevorzugten Ausführungsform tragen die Oligonukleotide zudem mindestens eine nachweisbare Markierung. Dabei ist dem Fachmann eine Vielzahl möglicher Markierungen bekannt. So können etwa Farbstoffe, Fluoreszenzmarkierungen, Radionuklide, elektrische Ladungsträger oder im Massenspektrometer nachweisbare Markierungen eingesetzt werden. Denkbar sind auch Peptid-Markierungen, die indirekt durch Bindung eines anders markierten Antikörpers nachgewiesen werden. Es sind auch chemische Markierungen möglich, die durch nachfolgende Umsetzung mit einem anders markierten Markermolekül sichtbar gemacht werden. Viele andere Markierungsmöglichkeiten gehören ebenfalls zum Stand der Technik. Bevorzugt tragen die Oligonukleotide unterschiedlicher Sequenz oder unterschiedlichen Methylierungsstatus unterschiedliche Markierungen.

15

20

25

30

In einer besonders bevorzugten Variante trägt das Oligonukleotid auf der einen Seite der Restriktionsstelle einen Fluoreszenzfarbstoff und auf der anderen Seite einen sog. „Quencher“. Erfolgt eine Restriktion, so werden Farbstoff und Quencher getrennt, so dass das

Farbstoffsignal detektiert werden kann (Abb.1). Einsetzbare Farbstoffe und Quencher sind dem Fachmann bekannt.

- 5 Die Oligonukleotide sind bevorzugt an eine Festphase gebunden. Die Art der Festphase und der Festphasenkopplung sind Stand der Technik. So kann es sich bei den Festphasen etwa um funktionalisierte Polymere, Metalle, Glas oder Halbleiter wie Silicium
- 10 handeln. Das Anbinden der Oligonukleotide kann u.a. über bifunktionale Linkermoleküle erfolgen, die an eine silanisierte Oberfläche gebunden werden oder etwa über Thioate oder Thiolmodifikationen im Oligonukleotid an Bromacetyl-derivatisierte Oberflächen oder Gold.
- 15 Bevorzugt sind die Oligonukleotide unterschiedlicher Sequenz oder unterschiedlichen Methylierungsstatus räumlich soweit voneinander entfernt, dass eine getrennte Detektion möglich ist.
- 20 In einer anderen bevorzugten Ausführungsform werden die Oligonukleotide auf eine sensitive Oberfläche aufgebracht, deren physikalische oder chemische Eigenschaften sich bei einer Restriktion meßbar verändern. Zu diesen meßbaren Eigenschaften gehören etwa
- 25 die Leitfähigkeit, die Eigenfrequenz oder die Oberflächenspannung. In einer besonders bevorzugten Variante besteht diese Oberfläche aus einem Piezo-Kristall. Die Anbindung von DNA an Piezo-Kristalle ist dem Fachmann bekannt (zur Übersicht: Skladal:
- 30 Piezoelectric Quartz Crystal Sensors Applied for Bioanalytical Assays and Characterisation of Affinity

Interactions. J. Braz. Chem. Soc., Vol.14, Nr.4, 491-502, 2003).

Die Hybrisierung der Oligonukleotide mit der zu  
5 untersuchenden DNA erfolgt unter Standardbedingungen.

Im zweiten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die Hybride mit hemimethylierungssensitiven Restriktionsenzymen umgesetzt. Die Auswahl der  
10 Restriktionsenzyme erfolgt nach der Sequenzspezifität der Enzyme und nach der zu untersuchenden diagnostischen oder wissenschaftlichen Fragestellung. Bevorzugt werden dabei Enzyme eingesetzt, die unmethylierte und hemimethylierte DNA bevorzugt gegenüber homomethylierter DNA schneiden.  
15 Geht man in diesem Fall von methylierten Oligonukleotiden aus, so können methylierte und unmethylierte Cytosinpositionen in der zu untersuchenden DNA unterschieden werden. Denn die methylierte DNA bildet mit den methylierten Oligonukleotiden homomethylierte  
20 Hybride, die von dem Restriktionsenzym nicht geschnitten werden. Bei unmethylierter DNA entstehen dagegen hemimethylierte Hybride, die vom dem Restriktionsenzym erkannt und umgesetzt werden. Geht man dagegen von unmethylierten Oligonukleotiden aus, so entstehen mit der  
25 methylierten DNA hemimethylierte Hybride und mit der unmethylierten DNA unmethylierte Hybride. Beide Hybride werden von dem Enzym geschnitten, so dass eine Unterscheidung zwischen methylierter und unmethylierter DNA bei Verwendung nicht-methylierter Oligos in diesem  
30 Fall nicht möglich ist. Der Einsatz der nicht-methylierten Oligonukleotide neben dem Einsatz methylierter Oligonukleotide derselben Sequenz erlaubt



jedoch eine Quantifizierung des Verfahrens. Aus dem Verhältnis beider Signale läßt sich das Verhältnis zwischen Gesamt DNA und methylierter DNA berechnen. Eine solche Quantifizierung ist einfach möglich, etwa wenn

5 methylierte und unmethylierte Oligonukleotide mit unterschiedlichen Markierungen versehen oder wenn sie räumlich getrennt an eine Festphase gebunden sind (Abb.2). Dem Fachmann ist bekannt, wie er Angaben zu Enzymen erhält, die in dieser Ausführungsform einsetzbar

10 sind. Insbesondere bietet die REBASE-Datenbank (<http://rebase.neb.com/>) vielfältige Informationen zu hemimethylierungssensitiven Restriktionsenzymen. Bevorzugt ist die Verwendung der folgenden Enzyme: AcsII; AdeI; AscI; HinfI; ClaI; EciI; HinfII; Hpy99I; NruI;

15 RsrII; SalI. Die Restriktionsstellen dieser Enzyme sind im Anhang aufgeführt. Reaktionsbedingungen der enzymatischen Umsetzung sind Stand der Technik und ergeben sich etwa aus den von den Herstellern gelieferten Protokollen.

20

In einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden Enzyme eingesetzt, die bevorzugt unmethylierte DNA gegenüber hemimethylierter und homomethylierter DNA schneiden. Erforderlich ist dann die

25 Verwendung unmethylierter Oligonukleotide (bzw. zur Quantifizierung zusätzlich der Einsatz methylierter Oligonukleotide). Nähere Informationen zu einsetzbaren Enzymen sind über die oben genannten Quellen verfügbar.

30 Sofern entsprechende Enzyme zur Verfügung stehen, ist es prinzipiell auch denkbar, mit Enzymen zu arbeiten, die keine unmethylierte, aber hemimethylierte und

homomethylierte DNA bzw. keine unmethylierte und hemimethylierte, aber homomethylierte DNA schneiden.

5 Es ist naheliegend, dass für das erfindungsgemäße Verfahren auch biologisch aktive Fragmente oder Modifikationen der Enzyme eingesetzt werden können. Mit zunehmendem Erfolg des Enzymdesigns ist auch die Verwendung speziell zum Zwecke dieser Erfindung konstruierter Enzyme denkbar.

10

Erfindungsgemäß ist es auch, mehrere unterschiedliche Restriktionsenzyme gleichzeitig oder nacheinander in Kombination mit verschiedenen Oligonukleotiden einzusetzen, um so den Methylierungszustand mehrerer  
15 unterschiedlicher Cytosinpositionen zu untersuchen.

20

Im dritten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Detektion. Dieser Schritt erfolgt je nach Versuchsansatz nach dem Stand der Technik. Werden  
20 markierte Oligonukleotide eingesetzt, so können die Markierungen entweder der ungeschnittenen Oligonukleotide oder der Restriktionsfragmente detektiert werden. Bei einer Festphasenanwendung ist es zudem möglich, die Restriktionsfragmente nachzuweisen, die sich in Lösung  
25 befinden oder die Fragmente, die an der Festphase gebunden sind (etwa bei Verwendung eines Quenchers). Bei Kopplung der Oligonukleotide an eine sensitive Oberfläche werden die sich durch die Restriktion verändernden chemischen oder physikalischen Eigenschaften gemessen.

30

Aus dem detektierten Signal wird dann im vierten Schritt auf den Methylierungsstatus der DNA geschlossen und der Anteil der methylierter DNA bestimmt.

5      Werden            krankheitsspezifische            Cytosinpositionen  
untersucht, so eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren  
insbesondere auch zur Diagnose von Krebserkrankungen oder  
anderen mit einer Veränderung des Methylierungsstatus  
assozierten Krankheiten. Hierzu gehören u.a. CNS-  
10      Fehlfunktionen,            Aggressionssymptome            oder  
Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und  
soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische  
Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder  
assozierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit,  
15      Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung  
oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes;  
Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des  
Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion,  
Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion,  
20      Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im  
Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder  
Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder  
der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion,  
Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle  
25      Fehlfunktion. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich  
außerdem zur Vorhersage von unerwünschten  
Arzneimittelwirkungen und zur Unterscheidung von  
Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der  
Zelldifferenzierung.  
30  
Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung  
hemimethylierungssensitiver Restriktionsenzyme zur

Methylierungsanalyse und zum Nachweis der oben genannten, mit einer Veränderung des Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten, insbesondere die Verwendung der Enzyme: AcsII; AdeI; AscI; HinPI; ClaI; EciI; HinPII; 5 Hpy99I; NruI; RsrII; SalI zu den oben genannten Zwecken.

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung besteht in einen Teststreifen, auf dem Oligonukleotide mit einem unterschiedlichen Methylierungsstatus und/ oder einer 10 unterschiedlichen Sequenz immobilisiert sind. Dieser Teststreifen wird in einer temperierten Minikammer mit der zu untersuchenden DNA hybridisiert. Restriktion und Detektion erfolgen anschließend in einem Schritt, etwa in einer Küvette, in der die Absorptionsspektren der 15 verwendeten Farbstoffe gemessen werden (Abb.3). In einer anderen bevorzugten Ausführungsform diffundieren die Restriktionsfragmente zu einer weiteren Phase und führen dort zu nachweisbaren Folgereaktionen.

20 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Kit, bestehend aus unterschiedlichen, immobilisierten Oligonukleotiden, mindestens einem hemimethylierungssensitiven Restriktionsenzym und den erforderlichen Restriktionspuffern.

25

#### Anwendungsbeispiel

Das folgende Beispiel soll die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Charakterisierung von Tumoren veranschaulichen. Ein Tumor tritt in zwei 30 unterschiedlichen Typen (A und B) auf, die jeweils eine unterschiedliche Behandlung erfordern. Die beiden Typen sind jedoch nicht ohne weiteres aufgrund morphologischer

Merkmale zu diagnostizieren; sie unterscheiden sich aber durch ihren Methylierungsstatus: ein CpG-Basenpaar, das innerhalb der Basenfolge GCGC in der Mitte eines bekannten Sequenzkontextes liegt, ist in Tumortyp A 5 methyliert, während es im Typ B nicht methyliert vorliegt. Zur Untersuchung wird die DNA aus dem Tumorgewebe mit einem kommerziell erhältlichen Kit extrahiert. Es erfolgt eine thermische Denaturierung der DNA und eine anschließende Hybridisierung mit einer 10 exakten 1:1 Mischung der beiden synthetischen Oligomere C und D. Diese besitzen die gleiche Basensequenz (komplementär zu der zu untersuchenden DNA), unterscheiden sich jedoch im Methylierungsstatus. Das CpG, das dem CpG entspricht, dessen Methylierung bestimmt 15 werden soll, ist bei C unmethyliert, bei D methyliert. C und D tragen unterschiedliche Fluoreszenz-Farbstoff-Quencher-Kombinationen, wobei sich jeweils an einem Ende des Oligonukleotids der Farbstoff und an dem anderen Ende ein Quencher befindet, der eine Detektion des Farbstoffs 20 verhindert. Nach der Hybridisierung erfolgt eine Restriktion der gebildeten DNA-Oligonukleotid-Hybride. Dazu wird zu der DNA eine hohe Menge des hemimethylierungssensitiven Restriktionsenzym HinPI hinzugefügt. Dieses Enzym schneidet im Sequenzkontext 25 GCGC hemimethylierte und unmethylierte DNA, nicht jedoch homomethylierte DNA. Mit Hilfe eines temperierten Fluoreszenzphotometers wird die Zunahme der beiden (nicht mehr durch den Quencher blockierten) Farbstoffe bei Fortschritt der Reaktion mit der Zeit gemessen. Nur die 30 Kombination aus methylierter DNA aus dem Tumorgewebe mit methylierten Oligomeren, in diesem Falle also A und D, führt zu beidseitig methylierter DNA. Diese DNA wird von

dem Restriktionsenzym nicht geschnitten, so dass kein Farbstoff freigesetzt wird. Der Anteil der methylierten DNA in der untersuchten Tumorprobe läßt sich durch das Verhältnis der freigesetzten Farbstoff der beiden  
5 Oligonukleotide D und C bestimmen. Dieser Wert erlaubt eine Aussage über den Tumortyp und somit eine optimale Behandlung.

#### Kurze Beschreibung der Figuren

10 Fig.1 zeigt eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung unter Verwendung eines Farbstoff-Quencher-Paares. Dabei ist ein methyliertes Oligonukleotid an eine Festphase gebunden. Das Oligonukleotid trägt einen Farbstoff (Fünfeck) und einen Quencher (Viereck). Die zu  
15 untersuchende DNA wird an die Oligonukleotide hybridisiert. Anschließend erfolgt der Umsatz mit einem Restriktionsenzym. Ist die zu untersuchende DNA unmethyliert, so wird das Hybrid geschnitten. Farbstoff und Quencher werden getrennt, und ein Signal kann  
20 detektiert werden.

Fig.2 zeigt eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung. Dabei werden zwei unterschiedliche Typen von Oligonukleotiden verwandt. Beide Oligonukleotide haben  
25 die gleiche Basensequenz. Sie unterscheiden sich allerdings in ihrem Methylierungsstatus und tragen unterschiedliche Farbstoffe (Kreis bzw. Fünfeck). An die Oligonukleotide wird die zu untersuchende DNA hybridisiert. Anschließend erfolgt eine Restriktion. Aus  
30 dem Verhältnis der Farbstoffsignale läßt sich der Methylierungsgrad der Probe (M) bestimmen.

Fig. 3 zeigt schematisch eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung. Dabei wird der Methylierungsstatus ein Tumorprobe mittels eines Teststreifens untersucht. Dazu wird die aus der Probe extrahierte DNA an auf einen  
5 Teststreifen fixierte Oligonukleotide hybridisiert (Schritt 1). Anschließend erfolgt eine Restriktion mit einem hemimethylierungssensitiven Restriktionsenzym. (Schritt 2). Je nach Methylierungsstatus der zu untersuchenden DNA ergeben sich unterschiedliche  
10 Farbmuster (A, B und C, Schritt 3). Aus früheren Experimenten ist bekannt, welche Methylierungsmuster mit bestimmten Typen des Tumors assoziiert sind (4). Durch Vergleich mit diesen Daten lässt sich eine Aussage über eine erfolgversprechende Tumorthherapie herleiten.

15

#### Anhang: Hemimethylierungssensitive Restriktionsenzyme

Die unten aufgeführten Enzyme zeigen eine Auswahl von möglichen, im erfindungsgemäßen Verfahren einsetzbaren Enzymen. Die Restriktionsstellen sind der REBASE-  
20 Datenbank entnommen. Die auf der linken Seite dargestellten Konformationen werden geschnitten. In der Mitte ist die Restriktion verlangsamt und auf der rechten Seite ganz blockiert.

25      Tabelle 1

ABC11

C C G C  
G G C G  
m5

m5  
C C G C  
G G C G

m5  
C C G C  
G G C G  
m5

m5  
C C G C  
G G C G

Ad21

m5  
C A C H N H G T G  
G T G H N H C A C

m5  
C A C H N H G T G  
G T G H N H C A C  
m5



---

 A8C1

n5  
G G C G C G C C  
C C G C G C G G

m5  
G G C G C G C C  
C C G C G C G G  
m5

n5  
G G C G C G C C  
C C G C G C G G  
m5

m5 m5  
G G C G C G C C  
C C G C G C G G  
m5 n5

n5  
G G C G C G C C  
C C G C G C G G

m5  
G G C G C G C C  
C C G C G C G G  
m5

m5  
G G C G C G C C  
C C G C G C G G  
n5

---

 H18P1

n5  
G C G C  
C G C G

n5  
G C G C  
C G C G  
m5

---

 ClaI

n5  
A T C G A T  
T A G C T A

n5  
A T C G A T  
T A G C T A  
m5

---

---

 EcoII

G G C G G A  
C C G C C T  
m5

G G C G G A  
C C G C C T  
n5

n5  
G G C G G A  
C C G C C T

n5  
G G C G G A  
C C G C C T  
n5

n5  
G G C G G A  
C C G C C T  
n5 m5

m5  
G G C G G A  
C C G C C T  
m5

---

 HinfII

m5  
G C G C  
C G C G

n5  
G C G C  
C G C G  
n5

n5  
G C G C  
C G C G

m5  
G C G C  
C G C G  
n5

m5  
G C G C  
C G C G  
n5

---

 Hpy99I

m5  
C G N C G  
G C N G C

m5  
C G N C G  
G C N G C  
m5

n5 n5  
C G N C G  
G C N G C  
n5 m5

---

---

 KruI

m5  
T C G C G A  
A G C G C T

m5  
T C G C G A  
A G C G C T  
m5

m5 m5  
T C G C G A  
A G C G C T  
m5 m5

m5  
T C G C G A  
A G C G C T

m5  
T C G C G A  
A G C G C T  
m5

---

 RseII

m5  
C G G W C C G  
G C C W G G C

m5  
C G G W C C G  
G C C W G G C  
m5

m5 m5  
C G G W C C G  
G C C W G G C  
m5 m5

---

 SalI

m5  
G T C G A C  
C A G C T G

m5  
G T C G A C  
C A G C T G  
m5

m5 m5  
G T C G A C  
C A G C T G

m5  
G T C G A C  
C A G C T G

m5  
G T C G A C  
C A G C T G  
m5

m5  
G T C G A C  
C A G C T G  
m5

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Untersuchung von Cytosinmethylierungen  
5 in DNA-Sequenzen, dadurch gekennzeichnet, dass  
a) die zu untersuchende DNA an Oligonukleotide eines  
definierten Methylierungsstatus hybridisiert wird,  
b) die Hybride mit mindestens einem  
hemimethylierungssensitiven Restriktionsenzym  
10 umgesetzt werden,  
c) detektiert wird, ob eine Restriktion stattgefunden  
hat,  
d) auf den Methylierungszustand der untersuchten DNA  
geschlossen wird.  
15
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
dass die Oligonukleotide an eine feste Phase gebunden  
sind.
- 20 3. Verfahren gemäß mindestens einem der voranstehenden  
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die  
Oligonukleotide mindestens eine nachweisbare  
Markierung tragen.
- 25 4. Verfahren gemäß mindestens einem der voranstehenden  
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die  
Oligonukleotide mit einem Farbstoff und einem  
Quencher markiert sind, die bei einer Restriktion  
getrennt werden.  
30
5. Verfahren gemäß mindestens einem der voranstehenden  
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass gleichzeitig  
sowohl methylierte wie auch unmethylierte  
Oligonukleotide derselben Sequenz verwendet werden.  
35

- 5 6. Verfahren gemäß mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die methylierten und unmethylierten Oligonukleotide unterschiedliche Markierungen tragen.
7. Verfahren gemäß mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mehrere Oligonukleotide unterschiedlicher Sequenz verwendet werden.
- 10 8. Verfahren gemäß mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotide an einer sensitiven Oberfläche immobilisiert sind, deren physikalische oder
- 15 chemische Eigenschaften sich bei einer Restriktion messbar verändern.
9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den veränderbaren Eigenschaften um
- 20 Leitfähigkeit, Eigenfrequenz oder Oberflächenspannung handelt.
10. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 8 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der
- 25 Oberfläche um einen Piezo-Kristall handelt.
11. Verfahren gemäß mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein Restriktionsenzym verwandt wird, dass unmethylierte und hemimethylierte DNA bevorzugt gegenüber
- 30 homomethylierter DNA schneidet.
12. Verfahren gemäß mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym
- 35 folgender Gruppe entnommen ist: AcsII; AdeI; AscI; HinPI; ClaI; EciI; HinPII; Hpy99I; NruI; RsrII; SalI.

13. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11 , dadurch gekennzeichnet, dass ein Restriktionsenzym verwandt wird, dass unmethylierte DNA bevorzugt gegenüber hemimethylierter und homomethylierter DNA schneidet.
14. Verfahren gemäß mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mehrere unterschiedliche Restriktionsenzyme gleichzeitig oder nacheinander eingesetzt werden.
15. Verwendung der Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 14 zur Diagnose von Krebserkrankungen oder anderen mit einer Veränderung des Cytosin-Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten, zur Vorhersage von unerwünschten Arzneimittelwirkungen und zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.
16. Verwendung von hemimethylierungssensitiven Restriktionsenzymen zur Methylierungsanalyse, insbesondere zur Diagnose von Krebserkrankungen oder anderen mit einer Veränderung des Cytosin-Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten, zur Vorhersage von unerwünschten Arzneimittelwirkungen und zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.
17. Verwendung gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass eines der folgenden Restriktionsenzyme verwendet wird: AcsiI; AdeI; AscI; HinPI; ClaI; EciI; HinPII; Hpy99I; NruI; RsrII; SalI.
18. Ein Teststreifen, auf dem Oligonukleotide mit einem unterschiedlichen Methylierungsstatus und/ oder einer

unterschiedlichen Sequenz immobilisiert sind, und der Restriktion und Detektion in einem Schritt erlaubt.

- 5      19. Ein Kit, bestehend aus immobilisierten Oligonukleotiden, mindestens einem hemimethylierungssensitiven Restriktionsenzym und den erforderlichen Restriktionspuffern.

## Zusammenfassung

Die folgende Erfindung betrifft ein enzymatisches  
5 Verfahren zur Untersuchung von Cytosin-Methylierungen in  
DNA-Sequenzen. Dabei wird die zu untersuchende DNA an  
Oligonukleotide hybridisiert. Die Hybride werden mit  
Restriktionsenzymen umgesetzt, die in der Lage sind,  
hemimethylierte DNA-Doppelstränge entweder von  
10 unmethylierten oder von homomethylierten DNA-  
Doppelsträngen zu unterscheiden. Über unterschiedliche  
Detektionsmöglichkeiten kann der Methylierungsstatus der  
zu untersuchenden Cytosin-Positionen bestimmt werden. Das  
Verfahren eignet sich insbesondere zur Diagnose von  
15 Krebserkrankungen und anderer mit einer Veränderung des  
Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten sowie zur  
Prognose unerwünschter Arzneimittelwirkungen.



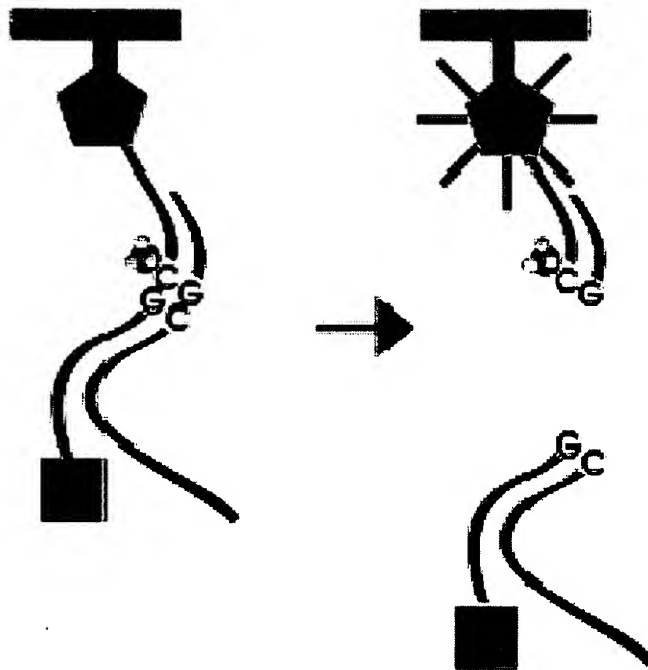
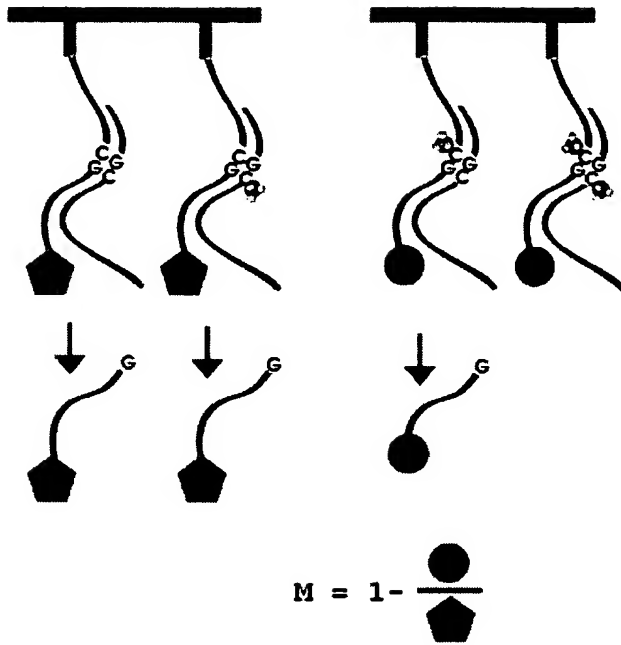
*Fig. 1*

Fig. 2



*Fig. 3*